

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 31420081150634

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

丝裂霉素大豆卵磷脂纳米复合物的制备及其性能的研究

Studies on the Preparation and Properties of MMC-SPC
nanocomplex

周春晓

指导教师姓名: 张其清 教授/博士生导师

侯振清 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 07 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

磷脂复合物作为一种新的给药体系，可以通过磷脂与药物之间发生的弱相互作用，而改善药物的一些药学特性，也可通过两者发生的较强的作用，而形成不同于原药和磷脂的新物质。复合物的形成能使药物作用时间延长，生物利用度提高，增加药物的脂溶性，还可以降低药物的不良反应。本文利用溶剂挥发法制备了丝裂霉素大豆卵磷脂（MMC-SPC）纳米复合物，并对其药效作用进行了初步研究。本文完成的工作主要包括以下几个方面：

(1) MMC-SPC 纳米复合物的制备和表征：制备 MMC-SPC 纳米复合物溶液，并通过正交试验筛选处方，得到的药物磷脂复合物在水中分散体系呈现粒径均一的多层囊结构，平均粒径为 210 nm，Zeta 电荷为 -34.5 mv。

(2) 制备 MMC-SPC 纳米复合物制剂的冻干品：为了进一步提高 MMC-SPC 纳米复合物的稳定性，采用 2% 的右旋糖酐作为冻干保护剂，通过冷冻干燥法制备 MMC-SPC 纳米复合物制剂的冻干品。采用加速试验，分别在室温及 4℃ 条件考察冻干品的稳定性，一共考察了 6 个月。具体考察的项目为外观色泽、药物含量、pH 值、粒径、再分散性、再分散后的澄明度等。结果：在加速试验考察期内，MMC-SPC 纳米复合物冻干品的外观色泽符合要求，含量无明显降低，pH 在规定范围内，粒径无明显变化，再分散性良好，澄明度符合要求。说明，将 MMC-SPC 纳米复合物溶液制成冻干品后可大大提高其稳定性。

(3) 细胞毒性试验：体外细胞培养实验采用 HeLa 细胞，MTT 结果显示：纯药 MMC 及 MMC-SPC 纳米复合物溶液对细胞的杀伤力均具有明显量效关系，且在较低浓度时 MMC-SPC 纳米复合物溶液对 HeLa 细胞的生长抑制率高于纯药 MMC。

(4) 体内抑瘤率试验：以荷肝癌实体瘤的昆明雄性小鼠为实验模型，通过尾静脉注射方式考察 MMC-SPC 纳米复合物的体内抑瘤效果。结果显示：MMC-SPC 纳米复合物在体内具有较好的抑瘤活性，且抑制效果具有明显的量效关系；与同剂量丝裂霉素针剂注射组相比，纳米复合物组的抑瘤率更高；观

察给药后剥离的肿瘤病理切片发现，与大豆卵磷脂形成纳米复合物的丝裂霉素药物可通过抑制癌细胞增值、并促其凋亡、从而起到对肝癌细胞的杀伤作用。

关键词：丝裂霉素，大豆卵磷脂，纳米复合物，溶剂挥发法。

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Phytosome is a new drug delivery system. Many natural drugs (especially some types of flavonoids) may exhibit a marked affinity for phospholipids. Phytosome, means drug-phospholipid complexes, may enhance the absorption of the drugs and show some superior chemico-physical properties. In this paper, mitomycin C-lecithin nanocomplex, which can stabilize mitomycin C (MMC) were prepared by a new emulsion solvent evaporation method, in which soybean phosphatidylcholine (SPC) was employed to form MMC-SPC complex. And its pharmacological activities in vivo and in vitro were investigated. The full work includes the following contents:

(1) MMC-SPC nanocomplex were prepared and the prescription composition was screened out by orthogonal design. The zeta-potential of nanocomplex was -34.5 mv and their mean diameters was about 210 nm.

(2) Using the freeze-dry protector-dextran of 2% to prepare the MMC-SPC nanocomplex freeze-dried powder. And its stability was investigated by acceleration test in room temperature and 4 °C for 6 months. Sampling was conducted every month to check the Dn, pH and redispersion ect. The results of the acceleration testing manifested that the Dn, pH had no evident variation, which means that lyophilizing MMC-SPC nanocomplex solution into freeze-dry powder can markedly increase the stability of MMC-SPC nanocomplex.

(3) In vitro cytotoxicity assay: The vitro cytotoxicity of the MMC and MMC-SPC nanocomplex were both obvious and dose-dependent. The test indicated that the MMC-SPC nanocomplex of low-concentration had enhanced in vitro cytotoxicity against Hela cells compared to the commercially available MMC injection.

(4) In vivo antitumor effect in H₂₂ bearing KunMing male mice: the in vivo antitumor effect in H₂₂-bearing KM male mice after i.v. injection of the MMC-SPC nanocomplex suggested that the inhibition effect of MMC-SPC nanocomplex was

obvious and dose-dependent and higher than that of MMC injection. Through pathological examination, it could be inferred that MMC-SPC nanocomplex had lethal effect to hepatoma carcinoma cell because of its functions with inhibiting tumor cells increase and leading its apoptosis.

Key words: Mitomycin C (MMC), soybean phosphatidylcholine(SPC), nanocomplex, solvent evaporation method.

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 绪论	1
1.1 丝裂霉素简介.....	1
1.2 磷脂复合物的研究发展.....	3
1.3 本课题的提出和研究内容	16
参考文献	18
第二章 丝裂霉素大豆卵磷脂纳米复合物的制备及表征.....	24
2.1 仪器与材料.....	24
2.2 实验方法.....	25
2.3 结果与讨论.....	28
2.4 结论	49
参考文献	51
第三章 丝裂霉素大豆卵磷脂纳米复合物的体外体内试验.....	53
3.1 仪器与材料.....	53
3.2 实验方法.....	55
3.3 结果与讨论.....	58
3.4 结论	65
参考文献	65
全文总结与展望	67
硕士期间科研成果及所获奖励	70
致谢.....	71

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 A Brief Description of MMC	1
1.2 The research of Phospholipid Complex	3
1.3 Main Focus of This Thesis.....	16
References	18
Chapter 2 Preparation and Characterization of MMC-SPC nanocomplex.....	24
2.1 Apparatus and Materials.....	24
2.2 Experiments.....	25
2.3 Results and Discussion	28
2.4 Summary.....	49
References	51
Chapter 3 The in vivo and in vitro test of of MMC-SPC nanocomplex.....	53
3.1 Apparatus and Materials.....	53
3.2 Experiments.....	55
3.3 Results and Discussion	58
3.4 Summary.....	65
References	65
Conclusions and Future Works	67
Publications and Rewards.....	70
Acknowledgements	71

第一章 绪 论

1.1 丝裂霉素简介

丝裂霉素 (mitomycin C, MMC, 又名自力霉素、密吡霉素), M_r 334.37, 氮丙啶类衍生物。自从 1956 年 Hata 第一个从土壤中分离丝裂霉素类抗生素开始 (由头状链霉菌产生), 因其特殊的抗肿瘤功能而引起了人们广泛的重视^[1]。丝裂霉素属于细胞周期非特异性抗肿瘤药, 抗瘤谱较广。从结构上看, MMC 具有乙烯亚胺基、乌拉坦及苯醌 3 种有效基团, 其化学结构式如下图 1.1 所示:

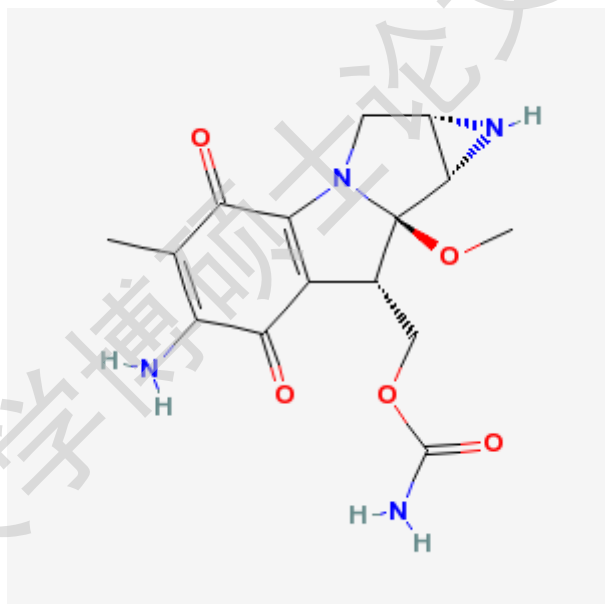


图 1.1 丝裂霉素 C 的结构式

Fig. 1.1 Structure of MMC

1.1.1 丝裂霉素的药理作用及毒性

丝裂霉素的作用机制: MMC 分子中的氨甲酰基与氮丙啶具有烷化功能。这些官能团在一定情况下被激活后, 成为不同的解离状态。激活态的 MMC 的主要作用为能使互补的 DNA 双键之间形成交联, 从而抑制肿瘤细胞的 DNA 的复制与合成, 而不是直接影响 RNA。丝裂霉素 C 和 DNA 结合时, 大部分只和其中的一条链结合, 一部分形成交联而阻碍了 DNA 双链的拆开, 同时也引

起单链断裂^[2]。

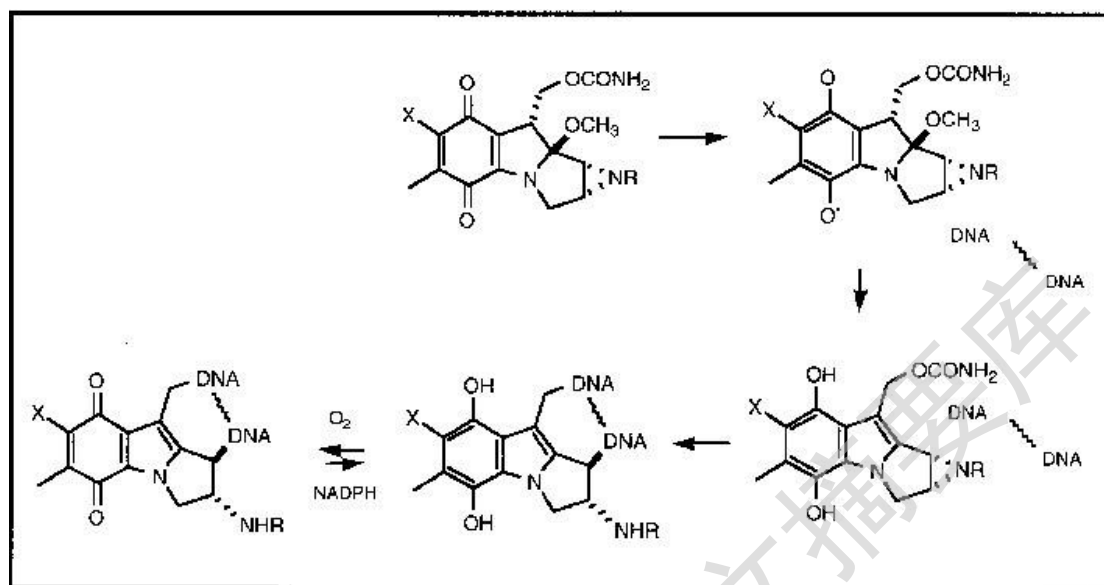


图 1.2 丝裂霉素 C 的抗癌分子机制

Fig. 1.2 The Anticancer Molecule Mechanism of MMC

MMC 为蓝紫色结晶或结晶性粉末，在安瓿瓶中呈针状或柱状，可溶于水，其水溶液对酸、碱、光、热皆不稳定，在 pH 为 6~9 时较稳定^[3]；易溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)等强极性溶剂；微溶于甲醇、丙酮、乙酸丁酯；略溶于苯、四氯化碳、乙醚；不溶于石油醚。结晶粉末很稳定，100℃ 加热 4 h 不降低效价^[4,5]。临床用于治疗消化道癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤^[6]。其中 MMC-C 是该类抗生素中研究得较深入和临床最常用的一种^[7]。但其具有全身毒性，特别是持久的骨髓抑制、白细胞和血小板减少、恶心、呕吐、腹泻、胃炎、皮炎发热和不适等亦有发生，并可引起溶血性尿毒综合征(HUS)。据文献报道，在接受 MMC 治疗 5-12 个月后，约 10% 的腺癌患者发生 HUS，引起肾功能减退。当累计剂量超过 60 mg 后，更易发生 HUS，且停药后症状持续加重^[8]。MMC 对心、肺等脏器的毒性也有报道，这些毒副作用极大的限制了它的应用。目前市场使用的 MMC 制剂有粉针剂、片剂、微胶囊剂等。徐英宏等还将丝裂霉素制成栓剂用于治疗直肠癌和结肠癌^[9]，但是这些传统剂型常常因为毒副作用大，或患者不能耐受而被迫停药。

1.1.2 丝裂霉素的研究进展

目前, MMC 制剂的研究重点主要集中在两个方面: 1) 开发新的类似药物, 以便找到低毒高效的可辅助甚至替代 MMC 的抗肿瘤抗生素; 2) 利用新的制药技术研制 MMC 新的给药剂型及途径, 以求降低其毒性, 提高疗效。近几年国内外出现的丝裂霉素 C 的新剂型包括毫微粒、纳米粒粉针剂、乳剂等。毫微粒 (nanoparticles) 通常包括毫微囊 (nanocapsules) 和毫微球 (nanospheres), 是由天然或合成的高分子材料制成, 粒径约在 1 ~ 1000 nm 的固态胶体颗粒。

Sansozena 等^[10]作了丝裂霉素毫微粒剂的研究, 实验过程利用聚己内酯装载药物丝裂霉素 C, 很大程度上提高了 MMC 的包封率 (从 7.93% 到 13.2%), 并且保证了 79% ~ 80% 的药物在 1 h 内释放, 且 6 h 后的剩余含药量仅为 10% ~ 20%; Bilensoy 等^[11]认为小于 400 nm 的毫微粒制剂在膀胱的肿瘤组织渗透能力较强, 可达到一定的靶向作用, 提高疗效; 乳剂是粒径为 1 ~ 100 nm 的乳滴分散在另一种液体中形成的胶体分散系统; Karadeniz 等^[12]利用原料泛影葡胺、碘油、丝裂霉素、司盘-80、表面活性剂异丙醇制备了 MMC 乳剂, 并用电化学的方法检测了这一新型药物输送系统。制备过程: 用泛影葡胺溶解丝裂霉素, 加入 2 倍量的碘化油, 按每毫升碘化油加入 2 滴灭菌的司盘-80, 充分振摇成为均匀灰白色的乳剂, 制成的乳剂具有一定的稳定性, 静置 24 h 后仍能呈均匀状态; 周红玲等^[13]制备利用乳化聚合法结合微射流技术制备 MMC-PBCA-NP 粉针剂, 生物相容性实验证明, MMC-PBCA-NP 没有溶血性。

开发得较为迅速的丝裂霉素制剂有经皮制剂, 气雾剂等^[14-16], 它们都展现了一定的开发前景, 此外, 合并用药可带来更好的疗效, 例如: Feliu 等^[17]报道丝裂霉素和多西他奇药物联合作为二线治疗, 调查了 38 名早期非小细胞肺癌患者。Wibmer 等^[18]研究 MMC 和长春瑞滨合用, 发现应答率达到 8%, 一年存活率达到 35%, 毒性与多西他奇单一成分治疗相似, 是一个耐受性好且有效的化学治疗方法, 而且对早期非小细胞肺癌患者毒性小, 甚至对 70 岁以上老人或者体力下降的人群也是一个很好的选择。

1.2 磷脂复合物的研究发展

磷脂复合物 (Phytosome, Phospholipid Complex) 是由意大利学者 Bombardelli 等人在研究脂质体的时候偶然发现的。药物和磷脂分子通过电荷迁移作用而形成

的较为稳定的化合物或络合物,它可改变母体药物的理化性质,提高生物利用度,且制备方法简单。自 20 世纪 80 年代以来,磷脂复合物逐渐引起重视,其研究日益深入。

制备复合物所用的磷脂为大豆磷脂或动物磷脂。天然磷脂主要来源大豆类植物或动物(牛、猪等)的皮、脑和肝脏,一般以从大豆和动物肝脏中提取得到的磷脂为好,磷脂的结构式如图 1.3 所示。磷原子上羟基中的氧原子有较强的得电子的倾向,而氮原子有较强的失电子的倾向,因此在一定条件下,可与一定结构的药物生成复合物。

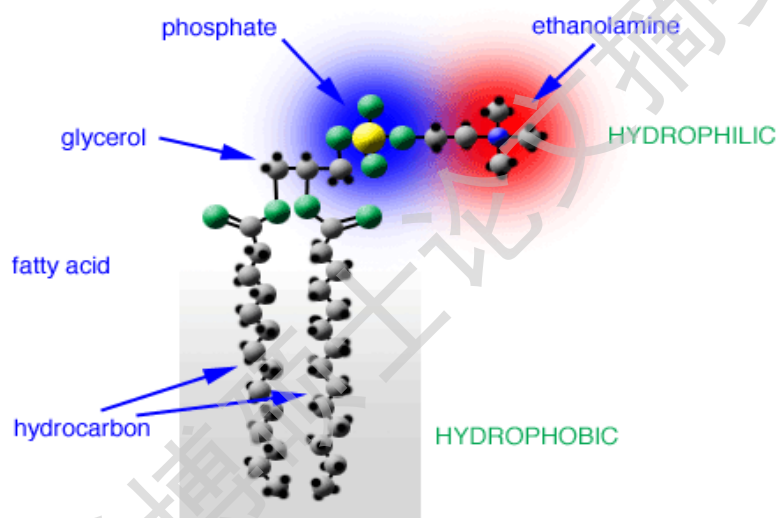


图 1.3 磷脂的化学结构

Fig. 1.3 The Chemical Structure of Phospholipid

1.2.1 药物磷脂复合物的制备方法

关于磷脂复合物的制备已有很多研究报道,通常的方法是将药物和磷脂置于非质子传递溶剂如芳烃、卤素衍生物或一些环醚中(如四氢呋喃、三氯甲烷、甲醇、乙醚、二氧六环等),通过加热、搅拌、回流等手段处理而制得。这是因为磷脂与药物结合的键为分子间作用力,在能电离的溶剂中,这种作用力很容易被打破,所以采用非质子溶剂。制备好的药物磷脂复合物可通过蒸发或在真空加压下去除溶剂得到,也可用冷冻干燥法或非溶剂沉淀法分离得到^[19]。有些药物与磷脂的复合反应也可在含水的溶剂中进行,如硫酸胆甾醇磷脂复合物的制备,将

硫酸胆甾醇溶于甲醇水(9:1)中, 然后加入 PE 使之反应, 反应产物用异辛烷提取, 蒸去异辛烷即得到硫酸胆甾醇-PE 复合物^[20]。

用超临界流体制备微细颗粒和结晶则是近十几年来备受关注的新技术。与传统的粉碎及结晶技术相比, 使用超临界流体可避免大量使用有机溶剂及由此造成的环境污染和除去产品中残留有机溶剂的繁琐步骤, 并可用于热敏感、结构不稳定及易失活变性的蛋白质、多肽类药物^[21]。目前国内始见有超临界流体技术制备磷脂复合物的报道, 李颖等^[22]运用超临界流体技术中的压缩流体反溶剂沉析技术(Solution Enhanced Dispersion by supercritical Fluid SEDS)系统考察葛根素磷脂复合物的制备条件, 对制得的复合物的性质进行考察并与传统溶剂法制备的复合物进行比较。四种不同的制备方法得到的葛根素磷脂复合物的存在形态、热力学稳定性、结构组成、粒径大小均相同, 以 SEDS 得到的磷脂复合物的溶出最快。该部分研究无疑为药物磷脂复合物的制备提供了一条新的思路, 具有一定的创新性。

磷脂复合物的组成、结构(示例见图 1.4)与同样由磷脂构成的脂质体不同, 见图 1.5。脂质体由双分子层磷脂与胆固醇组成, 药物包封于泡囊的亲水基团夹层中或分散于泡囊的疏水基团的夹层中^[23], 即通过磷脂把药物包裹在囊泡里, 这就意味着可能有成百甚至上千的磷脂分子来包围一个药物分子, 磷脂实际上并未与药物结合。而磷脂复合物则是一个整体, 活性成分通过与磷脂的极性基团相互作用而被固定, 而磷脂的 2 个长脂肪酸链不参与复合反应, 可自由移动, 包裹了磷脂的极性部位, 形成一个亲脂性的表面, 多个磷脂复合物分子有序排列, 形成不同于脂质体的球状体^[24]。通常活性成分与磷脂的比例为 1:1 或者 1:2, 因不同药物而异, 故含有等量药物分子脂质体的体积比磷脂复合物大得多。



图 1.4 姜黄素磷脂复合物的基本结构

Fig. 1.4 The basic model of a curcumin phytosome

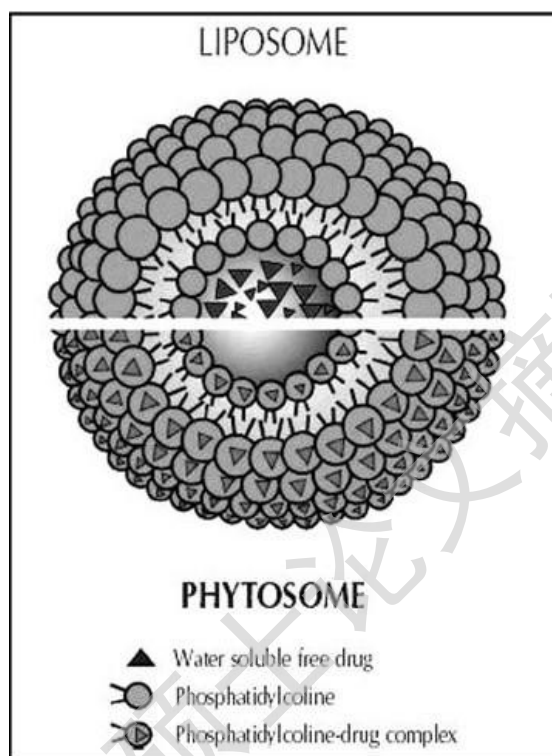


图 1.5 脂质体和磷脂复合物结构区别

Fig. 1.5 Major difference between liposome and phytosome

1.2.2 药物磷脂复合物的形成机制

1.2.2.1 分子间作用力观点

磷脂结构中磷原子上羟基中的氧原子有较强的得电子倾向，而氮原子有较强的失电子倾向，因此在一定条件下，它可与一定结构的药物形成复合物，这一观点在以下一些研究中已被证实。唐晓莽等^[25]研究认为，灯盏花素与磷脂的复合是一种弱的相互作用，从红外光谱分析可以初步看出在复合物中并无新的化学键生成，从结构上看磷脂含有带正电性的季胺氮，可与药物具有负电性的亲核基团产生的偶极-偶极作用力而使两分子结合，形成磷脂-药物复合物，在灯盏花素的结构中，羧基上的氧以及酚羟基上的氧均具有负电性，均可与带有正电性的季胺氮产生偶极-偶极作用力形成复合物。从灯盏花素磷脂复合物的差示量热扫描图来看，复合物的相变温度明显较灯盏花素与卵磷脂低，可能是由于灯盏花素与卵

磷脂极性部分的复合使得灯盏花素高度分散于卵磷脂的分子中,从而降低了卵磷脂两条疏水链间的有序性所致。李颖等^[22]根据 X-射线衍射分析,差示扫描量热分析,再结合葛根素与磷脂的分子结构特征认为,葛根素与磷脂之间的这种相互作用可能是电荷的传递作用。其 X-射线衍射分析图谱表明葛根素与磷脂之间可能发生电荷传递后,由于 Pur 与 PC 极性端的定向结合而使葛根素和磷脂处于一种高度分散的状态,其自身的晶体特征被抑制。按照 Mulliken 电荷传递理论,在电性差别比较大的两个分子间,多电子的分子向缺电子分子转移电子,这两个分子之间产生电荷迁移力,由这种力结合而形成分子复合物。在磷脂结构中,其胆碱部分季胺氮具有正电荷表明,其具有较强的接收电子的能力,符合电荷传递理论中电子受体的定义;而葛根素分子结构中供电性较强的酚羟基通过共轭体系向苯环转移电子,由于具有共轭体系,因而使整个共轭体系上的电子云密度均增大,4 位羰基氧由于其吸电子作用也显示负电性,符合电荷传递理论中电子给予体的定义。磷脂正电性的极性端与葛根素分子中负电性较高的部位之间在一定条件下发生电荷迁移,产生电荷迁移力,从而使葛根素分子与磷脂的极性端相互吸引并定向结合,形成葛根素磷脂复合物。杨鸿波^[26]研究认为,槲皮素与磷脂极性部位经范德华力、氢键等作用结合形成复合物,在各项性质上与物理混合物以及槲皮素和磷脂都有了明显的改变,具有了一些新的理化性质。

1.2.2.2 反胶束理论

最近,有研究者根据一些磷脂复合物核磁共振波谱的测定提出了另外一种形成机理,即反胶束理论。吴建梅等^[24]认为作为表面活性剂的磷脂在疏水性溶剂中可形成反胶束,这些反胶束呈现类似胶束的团状,但不同的是表面活性剂的极性端向内,非极性端向外。这些反胶束具有可容纳水分子的极性核心,与普通的胶束不同。在反胶束中,携带药物分子的磷脂极性端向内,而非极性端向外,多个磷脂复合物分子有序排列,形成团状,核心为水相,胶团排列紧密,这样的结构对药物分子实际上起到了屏蔽作用,因而在核磁共振图谱中药物分子的信号未能清晰地表现,磷脂分子的极性端也受到了一定的影响,其相应的信号变宽,而其非极性端在有机溶剂中可自由转动,故其信号不发生变化,药物磷脂复合物核磁共振光谱特征可能是个体与集合体特征的共同反映。

目前对于磷脂复合物的形成机制尚有争议,大多研究者倾向于认为药物与磷

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库